

## Mikobakteri Türlerinin İdentifikasyonunda Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Parça Uzunluk Polimorfizmi Tekniği ile Klasik Yöntemler Arasındaki Uyumun Belirlenmesi

### Determination of Coherency Between Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Technique and Conventional Methods for the Identification of Mycobacteria at the Species Level

Gül BAYRAM<sup>1</sup>, Gürol EMEKDAŞ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Mersin Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Mersin

<sup>2</sup>Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mersin

#### Özet

**Amaç:** Günümüzde tüberkülozun laboratuvar tanısında ve identifikasyonunda karşılaşılan çeşitli zorluklar mevcuttur. Bu çalışmada mikobakteri identifikasyonunda klasik biyokimyasal yöntemler ile moleküler yöntemler arasındaki uyumun belirlenmesi amaçlanmıştır.

**Yöntem:** Biyokimyasal identifikasyonda, nitrat, katalaz ve niasin testleri, moleküler biyolojik teknik olarak Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Parça Uzunluk Polimorfizmi yöntemi kullanılarak, *Mycobacterium spp.* olarak izole edilen mikobakterilerin identifikasyonu yapılmıştır.

**Bulgular:** Örneklerin ekim öncesi yapılan Ehrlich Ziehl Neelsen direkt incelemelerinde aside dirençli basil örneklerin 30'unda (%30) saptanmıştır. Örneklerin 43'ü (%43) kültür yöntemi ile pozitif bulunurken, Ehrlich Ziehl Neelsen ve kültürün aynı anda 30'u (%30) pozitif olarak belirlenmiştir. Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Parça Uzunluk Polimorfizmi yöntemi ile *Mycobacterium spp.* olarak izole edilen 7 izolatin (%16.3) Nontüberküloz Mikobakteriler olduğu geri kalan 36 (%83.7) örneğin *Mycobacterium tuberculosis* complex olduğu tespit edildi. Klasik identifikasyon sonucunda 40 suşun katalaz testi düşük, 41 suşun nitratı pozitif bulunurken, 30 suşun niasin testi pozitif bulundu.

**Sonuç:** Bu çalışmada biyokimyasal identifikasyon moleküler yöntemle uyumu kapa istatistiği ile değerlendirildi. Bu iki yöntem arasındaki uyum orta derecede çıkmıştır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Parça Uzunluk Polimorfizmi yönteminin en önemli dezavantajı zaman zaman yanlış pozitif ve negatif sonuçların ortaya çıkabilmesidir. Bu nedenle tüberkülozun laboratuvar tanısında klasik ve moleküler yöntemlerin sonuçları değerlendirilirken mutlaka klinik ön tanı ile birlikte değerlendirilmesi gerektiği düşüncesindeyiz.

**Anahtar sözcükler:** *Mycobacterium tuberculosis* complex, Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Parça Uzunluk Polimorfizmi tekniği, identifikasyon

Mersin Univ Sağlık Bilim Derg, 2008;1(3):8-13

Geliş Tarihi : 13.03.2008

Kabul Tarihi : 24.07.2008

**Yazışma Adresi:** Gül BAYRAM

Mersin Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Mersin

Tel : 0-324-2347723

Faks : 0-324-2346410

E-posta : gulbayram78@yahoo.com

#### Abstract

**Objective:** There are still various problems at diagnosis and identification of tuberculosis. The aim of this study was to determine the coherency between molecular biologic and classical biochemical methods for the identification of *Mycobacterium* at the species level.

**Method:** While nitrate, catalase and niacin tests were used for biochemical identification, Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism technique was used as molecular biologic method for isolated *Mycobacterium spp.*

**Results:** It was detected that 30% of samples were positive with acid-fast bacilli smear before cultivation. While 43% of samples were culture positive by cultivation 30% of samples were positive for acid-fast bacilli smear and culture at the same time. 7 isolates (16.3%) were identified as Mycobacteria other than tuberculosis and 36 (83.7%) isolates were identified as *Mycobacterium tuberculosis* complex with Restriction Fragment Length Polymorphism technique. According to the biochemical identification, 40% of isolates had low activity for catalase test, 41% of isolates were positive for nitrate test, 30% of isolates were positive for niacin test.

**Conclusion:** Coherency between Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism and conventional methods was evaluated by kappa statistics in our study. Coherency between two methods was determined as middle degree. Disadvantages of Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism technique are false positive and negative results which can occur occasionally. We determined that classical and molecular techniques must be evaluated with clinical features at diagnosis of tuberculosis.

**Key Words:** *Mycobacterium tuberculosis* complex, Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism), identification.

## Giriş ve Amaç

Tüberküloz, *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTC) olarak tanımlanan bir grup mikobakteri tarafından oluşturulan, çok değişik klinik görünümlere sahip, kronik bir enfeksiyondur (1). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından tüm dünya nüfusunun yaklaşık üçte birinin tüberküloz basili ile infekte olduğu, her yıl 9 milyon yeni tüberküloz vakası ortaya çıktığı ve her yıl 2 milyon kişinin tüberkülozdan öldüğü bildirilmiştir. DSÖ'nün verilerine göre tüberkülozlu hastaların %80'i Afrika (sahra-altı) ve Asya'da yaşamaktadır (2).

Klinik ve radyolojik bulgular sonucu tüberküloz şüphesi ile gönderilen klinik örneklerde mikobakterilerin saptanmasında ilk basamak olarak, aside dirençli boyama (ARB) yöntemi uygulanmaktadır. Tüberkülozun tanısında altın standart olarak kullanılan kültür yöntemi basilin tiplendirilmesi ve duyarlılık testlerinin yapılabilmesini sağlamaktadır. Son yıllarda mikrobiyolojinin tüm alanlarında kullanılan moleküler biyolojik yöntemler mikobakterilerin tanısında ve tiplendirilmesinde kullanılmakta, bu sayede patojen olan veya olmayan, sadece çevre kaynaklı olan ve çok nadir olarak görülen yeni mikobakteri türleri de tanımlanabilmektedir (3).

Tüberküloz basilinin hızlı identifikasyonunda moleküler yöntemlerden biri olan polimeraz zincir reaksiyonu-parça uzunluk polimorfizmi [Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)] tekniği birçok araştırmacı tarafından önerilmektedir (4-8). MTC'nin tanımlanmasında kullanılan klasik yöntemler ise, bakterilerin üreme hızına, üreme ısısına, koloni görünümüne, pigment üretimine ve biyokimyasal özelliklerine dayalı yöntemlerdir. Biyokimyasal testlerin bir arada kullanılması ile sağlanacak identifikasyon oldukça zor ve zaman alıcı olduğundan rutinde birkaç test MTC ve tüberküloz dışı mikobakteriler [Mycobacteria Other Than Tuberculosis] (MOTT)'in ayrımı için kullanılmaktadır. Biyokimyasal yöntemlerde, kültür yöntemleriyle bakteri üretildikten sonra, MOTT türlerinin fenotipik özellikleri araştırılmaktadır. Fakat fenotipik özellikler sınırlı sayıda türün birbirinden ayırtedilebilmesini sağlar. Örneğin katalaz testi, *M. tuberculosis*, *M. gastri* ve *M. kansasii*'yi diğer mikobakterilerden ayırtedebilmek amacıyla kullanılır. Tüm mikobakteriler katalaz deneyi ile olumlu sonuç verirken, bu üç mikobakteri türü olumsuz sonuç verirler (9). Bu nedenle biyokimyasal identifikasyon tek başına tüberkülozun tanısında yeterli değildir. Günümüzde klinik örneklerde saptanan mikobakterilerin tür düzeyinde identifikasyonu için biyokimyasal testler yerine moleküler yöntemler tercih edilmektedir. Yapılan çalışmalarda PCR-RFLP yönteminin rutin laboratuvar kullanımına uygun, ekonomik, pratik ve hızlı bir yöntem olduğu bildirilmiştir (5,6).

Bu çalışmada mikobakteri identifikasyonunda klasik biyokimyasal yöntemler ile moleküler yöntemler arasındaki uyumun belirlenmesi amaçlanmıştır.

## Yöntem

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarına tüberküloz şüphesi ile rutin olarak gönderilen toplam 100 örnek (balgam, idrar, steril vücut sıvısı (SVS), bronkoalveolar lavaj (BAL), plevral mayi, apse ve açlık mide suyu (AMS) hem LJ besiyerine hem BACTEC besiyerine ekildi. Bu kültürlerden izole edilen *Mycobacterium spp.* izolatları çalışmaya dahil edildi.

### Klasik Biyokimyasal İdentifikasyon

Mikobakteri üremesi tesbit edilen LJ ve BACTEC besiyerinde (yaklaşık olarak 10-40 gün sonra) üreyen bakterilere biyokimyasal tiplendirme yapıldı. Biyokimyasal tiplendirme için, kültürlerden 1 öze dolusu koloni alınarak nitrat, katalaz ve niasin testleri uygulandı. (10). Testlerde kontrol olarak *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. austroafricanum* ve *H37Rv* standart suşları kullanıldı.

### DNA İzolasyonu

Hızlı DNA saflaştırma yöntemi ile DNA izolasyonu, bunu takiben PCR yapıldı. DNA izolasyonu için üremenin olduğu katı besiyerlerinden 1 öze dolusu koloni 1 ml distile suya alınarak ya da BACTEC besiyerinden 1 ml sıvı alınarak yapıldı. Bunlar daha sonra benmaride 20 dakika 80 °C inkübe edildikten sonra 12000x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı atıldıktan sonra üzerine 200 µL kloroform eklenip vorteksledikten sonra 6000x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı atılmadan üzerine 200 µL steril distile su eklenerek 12000x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı steril eppendorf tüpüne alınarak PZR amplifikasyonunda kalıp DNA olarak kullanıldı (11).

### PCR Amplifikasyon Aşamaları

PCR ile mikobakterilerin ısı şok proteini (hsp65), forward ve reverse primerler kullanılarak çoğaltıldı. PCR koşullarının standardizasyonu amacıyla ön denemeler yapıldı. PCR karışımı kontaminasyonun önlenmesi amacıyla steril, temiz kabinlerde hazırlandı. PCR karışımı toplam hacim 50 µL olacak şekilde, 1X PCR tampon (Sigma), 2.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega), 0.2 mM dNTP (Fermentas), 0.5 µM/L primer çiftleri (Tb11 [5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT] ve Tb12 [5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT]), 2.5 U/ µL Taq polimeraz (Sigma) ve 2 µL izole edilen DNA örneğini içermektedir (4). Örnekler "thermal cycler" cihazında (Eppendorf, Mastercycler, Germany) amplifiye edildi. Amplifikasyon koşulları, 95 °C'de 10 dakika başlangıç

denatürasyonundan sonra, 45 siklus 94 °C'de 1 dakika denatürasyon, 55 °C'de 1 dakika primer bağlanması ve 72 °C'de 1 dakika uzama aşamalarının tekrarı ve bunu izleyen 72 °C'de 10 dakika son uzama aşamalarından oluşmaktadır. PCR amplifikasyonu sonucu beklenen bant büyüklüğü ≈439 bp olup, ürünlerin %2'lik agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılmasından sonra, agaroz jel etidyum bromid ile boyanarak UV translüminatörde incelendi.

#### Parça Uzunluk Polimorfizm Analizi

PCR sonrası oluşan ürünler *Hae* III ve *BstE* II enzimleri ile kesildi. Bu enzimlerin tanıma bölgeleri ve kesim sonucu oluşacak bant uzunlukları her mikobakteri türü için farklı olup tür değerlendirme cetveline göre mikobakterilerin tür düzeyinde değerlendirilmeleri yapıldı. *BstE* II ve *Hae* III kesim enzimlerini içeren reaksiyon tüpleri sırasıyla 60 °C ve 37 °C'de 2'şer saat inkübe edildi. Kesim reaksiyon karışımı ise son hacim 24 µL olacak şekilde, 1X restriksiyon enzim tamponu (Fermentas), 1 U/µL restriksiyon enzimi ve 10 µL PCR ürününden oluşmaktadır. Kesim reaksiyonunu takiben örnekler % 3'lük agaroz jelde yapılan elektroforez ile yürütüldü. Her iki enzimle kesim sonucu elde edilen bant uzunluklarına göre mikobakteri türlerinin identifikasyonu yapıldı (5).

Bu çalışmanın istatistiksel analizi SPSS 11.5 istatistik programında yapıldı. Kappa istatistiği uygulandı.

## Bulgular

Hastaların %60'ı erkek (60 hasta), %40'ı kadın (40 kadın) olup örneklerin dağılımı; 70 (%70) balgam, 14 (%14) idrar, 5 (%5) steril vücut sıvısı (SVS), 2 (%2)

bronkoalveolar lavaj (BAL), 4 (%4) plevral mayi, 3 (%3) apse ve 2 (%2) açlık mide suyu (AMS) şeklindedir.

Kültürde üremesi olan tüm örnekler klasik yöntem ve moleküler yöntemle tiplendirme yapıldı. Klasik yöntemde nitrat, katalaz ve niasin testleri uygulandı. Bunun sonucunda 40 suşun katalaz testi düşük, 41 suşun nitratı pozitif bulundu (Tablo 1). Elde edilen sonuçlar moleküler yöntemle uyumlu olarak belirlenirken bu sonuçlar niasin testi için geçerli bulunmadı. Kültürde pozitif olarak üremiş suşların koloni miktarı az ise, niasin testi negatif olarak saptanırken bu suşlar moleküler tiplendirme sonucu MTC olarak saptandı.

Biyokimyasal identifikasyonun moleküler yöntemle olan uyumuna bakıldığında sırasıyla kappa değeri nitrat, katalaz ve niasin testleri için kappa=0.462, kappa=0.63, kappa=0.54 olarak saptandı. Buna göre iki yöntem arasındaki uyum orta derecede çıkmıştır.

PCR sonrası yaklaşık 439 bp uzunluğunda elde edilen ürünler *Mycobacterium spp.* olarak tanımlandıktan sonra *BstE* II ve *Hae* III enzimleri ile kesimleri yapılarak tiplendirilmiştir. Şekil 1'de *Mycobacterium tuberculosis complex* (MTC) ve Nontüberküloz Mikobakteriler (NTM) olarak tiplendirilen hastaların elektroforez sonrası bant paternleri gösterilmiştir.

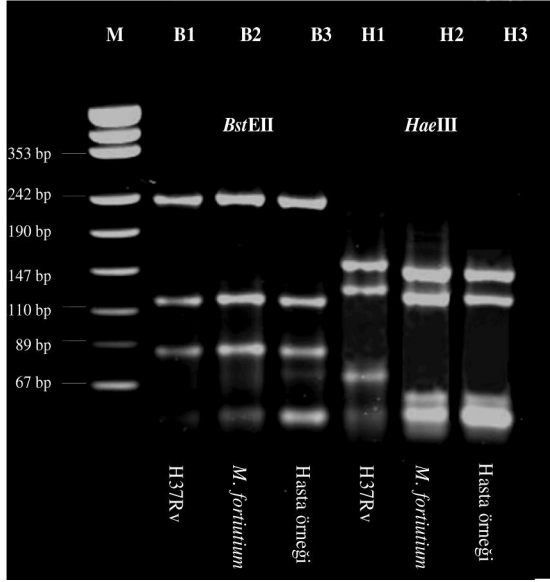
Moleküler yöntemle *Mycobacterium spp.* olarak izole edilen 43 (%43) örneğin 7'sinin (%7) NTM olduğu geri kalan 36 (%36) örneğin MTC olduğu tespit edilmiştir. Tablo 2'de örneklerin PCR-RFLP sonuçları verilmiştir.

**Tablo 1.** Klasik tiplendirme sonuçları

İncelenen Suş Sayısı	Nitrat		Katalaz		Niasin	
	Pozitif	Negatif	Düşük	Yüksek	Pozitif	Negatif
43	41	2	40	3	30	13

**Tablo 2.** Örneklerin PCR/RFLP sonuçları

Örnek	PCR		PCR/RFLP sonucu		
	<i>Mycobacterium spp.</i>	Negatif	MTC	NTM	
Balgam (n=70)	26	44	24		2 <i>M. fortuitum</i>
İdrar (n=14)	10	4	5		5 <i>M. fortuitum</i>
SVS (n=5)	1	4	1		0
BAL (n=2)	1	1	1		0
Abse (n=3)	3	0	3		0
Plevral Mayi (n=4)	2	2	2		0
AMS (n=2)	0	2	0		0
Toplam (n=100)	43	57	36		7 suş



**Şekil 1.** Mikobakteri tür ayrımında, örnek izolatların *BstEII* ve *HaeIII* RFLP patternleri. Kolon M; moleküler ağırlık standardı (pUC 18 Msp I digest, Sigma, D 4797), kolon B1; H37Rv (*Mycobacterium tuberculosis*) *BstEII* kesimi (245/115/80 bp), kolon B2; *M. fortuitum* *BstEII* kesimi (245/115/80 bp), kolon B3; hasta örneği *BstEII* kesimi (245/115/80 bp), kolon H1; H37Rv *HaeIII* kesimi (160/140/70 bp), kolon H2; *M. fortuitum* *HaeIII* kesimi (150/135/60/55 bp), kolon H3; hasta örneği *HaeIII* kesimi (150/135/60/55 bp).

## Tartışma ve Sonuç

DSÖ verilerine göre her yıl yaklaşık 3 milyon kişinin ölümüne yol açması, takibi zor olması gibi nedenlerle mikobakteriyel enfeksiyonların erken tanı ve tedavisinde moleküler yöntemler gündeme gelmiştir (12). Tüberkülozun tanısında kullanılan moleküler yöntemler genellikle PCR tabanlı teknikler olup hızlı identifikasyon amacı ile PCR-RFLP yöntemi tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır (6,7). Çalışmamızda mikobakterilerin identifikasyonu için moleküler teknik olarak PCR-RFLP tekniği kullanılmıştır. Bu teknik kullanılarak tüm mikobakterilere spesifik olan 65 kilo daltonluk ısı şok proteini bölgesine ait PCR ürününün restriksiyon enzimleri ile kesilerek mikobakteri türleri belirlenmiştir (4,5).

Bu çalışmada tüberküloz şüphesi ile gönderilmiş ve kültürü pozitif olan örnekler klasik ve moleküler yöntemle tiplendirme yapılmıştır. Çalışmamızda örneklerimizin %43'ünde LJ/BACTEC pozitifliği ve PCR pozitifliği tespit edilmiştir. Kültür ve PCR pozitif 36 (%83.7) örnek klasik yöntem ve PCR-RFLP ile MTC olarak, 7 örnek ise NTM (%16.3, *M. fortuitum*) olarak identifiye edilmiştir.

Tüberküloz basilinın identifikasyonunda kullanılan alternatif yöntemlerden olan nükleik asit hibridizasyon tekniklerinin uygulanması kolay, hızlı ve pratiktir. Klinik örneklerden tüberküloz basil kompleksinin identifikasyonunda kullanılacak çok sayıda moleküler yöntem mevcuttur. Ancak bu yöntemlerin standardizasyonu halen sağlanamamıştır (13-15).

Noordhoek ve ark. (16) tarafından yapılan bir çalışmada nükleik asit amplifikasyon tekniklerinin doğruluğu değerlendirilmiştir. Bu çalışmaya 18 ülkeden 30 laboratuvar katılmış olup 20 örnek çalışılmıştır. Bunlar içerisinde sadece 5 laboratuvar örnekleri doğru bir şekilde identifiye edebilmiştir (16).

Benzer bir çalışma 2004 yılında 23 ülkede 82 laboratuvarında çeşitli ticari nükleik asit amplifikasyon teknikleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmada birçok farklı laboratuvar duyarlılığı yüksek ve hızlı moleküler teknikler kullanılmasına rağmen yanlış pozitif ve negatif sonuçlar elde edildiği için ve laboratuvarlar arasındaki uyumsuzluk nedeniyle yakın gelecekte moleküler tekniklerin konvansiyonel yöntemlerin yerini almayacağı belirtilmiştir (17).

Yayma ve kültür negatif olan olgularda ortamda bulunan basil sayısı çok az sayıda olsa bile tüberküloz tanısı yapılabildiği için PCR-RFLP yöntemi oldukça duyarlı ve spesifik bir tekniktir. Ayrıca bu yöntemle NTM'ler saptanabilmektedir. Ancak bu yöntemde bazı mikobakteri türlerinin bant paternlerinin birbirine çok yakın olması nedeniyle identifikasyon zaman zaman güçleşmektedir (4). Ayrıca ortamda bulunabilecek inhibitör ya da kontaminant ajanlar nedeniyle ortaya çıkan yanlış pozitif veya yanlış negatif olguların önüne geçilmesi için mutlaka negatif ve pozitif kontrollerle birlikte çalışılması gerekmektedir.

Günümüzde laboratuvar ortamında izole edilen mikobakterilerin MTC ya da NTM olup olmadığını rutin olarak tespit edebilmek için çeşitli biyokimyasal identifikasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Bu amaçla kord faktör oluşumu, MacConkey agarda, kanlı agarda üreme testi, NAP (p-nitro- $\alpha$ -acetylamino- $\beta$ -hydroxypropiofenone) testi gibi testlerin yanı sıra; katalaz testi, niasin testi, pirazinamidaz testi, thiophene-2 karboksilik asit hidrazid testi gibi birçok biyokimyasal test kullanılmaktadır (10).

Bu çalışmada biyokimyasal identifikasyonun moleküler yöntemle olan uyumuna bakıldığında sırasıyla kappa değeri nitrat, katalaz ve niasin testleri için kappa=0.462, kappa=0.63, kappa=0.54 olarak saptanmıştır. Buna göre iki yöntem arasındaki uyum orta derecede çıkmıştır.

Moleküler tanı yöntemleri yalnızca tüberküloz basillerinin belirlenmesinde değil, aynı zamanda bu basillerin tiplendirilmesinde de kullanılmaktadır. Biyokimyasal tiplendirme yöntemleri uzun zamandır kullanılmakla birlikte bu yöntemler kültüre dayalı oldukları için rutinde uzun sürede sonuç vermektedirler.

Biyokimyasal tiplendirme tek başına tüberkülozun tanısında yeterli olmadığı için günümüzde moleküler yöntemlerle birlikte kullanılmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda moleküler yöntemlerle yapılan tiplendirmenin biyokimyasal yöntemlere göre daha duyarlı olduğu saptanmıştır (18,19).

Tüberkülozun laboratuvar tanısında ve izole edilen etkenlerin identifikasyonunda ve duyarlılığının belirlenebilmesinde kültür halen altın standart olarak yerini korumaktadır. Ancak mikobakterilerin besiyerinden izolasyonları için 6–8 hafta inkübe edilmesi ve klasik identifikasyon için ise 2–4 haftalık zaman gerekmektedir (3). Bundan dolayı izolasyon, identifikasyon ve duyarlılık belirlenmesinde daha hızlı moleküler yöntemler kullanıma girmeye başlamıştır. Özellikle yayma ve kültür negatif olan olgularda ortamda bulunan basil sayısı düşük miktarda olduğu durumlarda PCR-RFLP yöntemi ile mikobakterilerin izolasyon ve identifikasyonu umut verici görünmekle birlikte yöntemin en önemli dezavantajı zaman zaman yanlış pozitif ve negatif sonuçların ortaya çıkmasıdır. Elde edilen yanlış negatif ve yanlış pozitif sonuçların, kullanılan yöntemin standardize olmamasından, izolasyon sırasında ortamda bulunan inhibitör, kontaminant maddelerden, yetersiz ekstraksiyon ve homojenizasyon ve dekontaminasyon şartlarından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tüberküloz basiline identifikasyonunda, alternatif olarak kullanılan birçok moleküler yöntemin; uygulanması kolay, hızlı ve pratik olmasına rağmen standardizasyonu halen sağlanamamıştır. Bu nedenle tüberkülozun laboratuvar tanısında klasik (ARB ve LJ/BACTEC) ve moleküler yöntemlerin sonuçlarının klinik ön tanı ile birlikte değerlendirilmesi önerilmektedir.

Sonuç olarak, yaptığımız hızlı moleküler tiplendirmenin mutlaka altın standart kültür yöntemleri ile birlikte uygulanması gerektiği düşüncesindeyiz.

## Kaynaklar

1. Tevfik C, Aydın M, Mısırlıgil A. Tıp ve Diş Hekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji. Ankara; Güneş Kitabevi, 2004;417-29.
2. World Health Organization. *Global tuberculosis control: surveillance, planning, fi nancing. WHO report*, 2006. Erişim: <http://www.who.int/topics/tuberculosis/en/.html> Erişim Tarihi: 15.05.2006.
3. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyoloji.10. baskı, İzmir: Barış kitabevi, 2000;439–86.
4. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1993;31(2):171–8.
5. Ergin A, Kocagöz T, Us AD, Günali A. Polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon enzim analizi ile mikobakterilerin tür düzeyinde tanımlanması. *Mikrobiyol Bult* 1999;33:251–61.
6. Taylor TB, Patterson C, Hale Y, Safraneck WW. Routine use of PCR-Restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. *J Clin Microbiol* 1997;35(1):79–85.
7. Brunello F, Ligozzi M, Cristelli E, Bonora S, Tortoli E, Fontana R. Identification of 54 mycobacterial species by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of the *hsp65* gene. *J Clin Microbiol* 2001;39(8):2799–806.
8. Steingrube VA, Gibson JL, Brown BA, Zhang Y, Wilson RW, Rajagopalan M, Wallace RJ Jr. PCR amplification and restriction endonuclease analysis of a 65-Kilodalton heat shock protein gene sequence for taxonomic separation of rapidly growing mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1995;33(1):149–53.
9. Alp A. Non-tüberküloz mikobakteri infeksiyonlarında laboratuvar tanı ve duyarlılık testleri. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu, Samsun, 2003. Kurs Kitabı; 388–96.
10. Sürücüoğlu S. Tüberküloz basillerinin identifikasyonu. III. Tüberküloz sempozyumu ve III. Tüberküloz laboratuvar tanı yöntemleri uygulama kursu, Adana, 2004. Kurs Kitabı; 30–43.
11. Sajduda A, Brzostek A, Popławska M, Augustynowicz-Kopeć E, Zwolska Z, Niemann S, Dziadek J, Hillemann D. Molecular characterization of rifampin- and isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis strains isolated in Poland. *J Clin Microbiol* 2004;42(6):2425-31.
12. World Health Organization. *2008 Tuberculosis Facts*. Erişim:<http://www.who.int/tb/publications/2008/factsheet>. Erişim Tarihi: 10.11.2008.
13. Ichijama S, Ito Y, Sugiura F, Iinuma Y, Yamori S, Shimojima M, Hasegawa Y, Shimokata K, Nakashima N. Diagnostic value of the strand displacement amplification method compared to those of Roche Amplicor PCR and culture for detecting mycobacteria in sputum samples. *J Clin Microbiol* 1997;35:3082–5.
14. Grosset J, Mounton Y. Is PCR a useful tool for the diagnosis of tuberculosis in 1995? *Tubercle Lung Dis* 1995;76:183-4.
15. Bogard M, Vincelette J, Antinozzi R, Alonso R, Fener T, Schirm J, Aubert D, Gaudreau C, Sala E, Ruiz-Serrano M, Petersen H, Oostendorp L, Burkardt H. Multicenter study of a commercial, automated polymerase chain reaction system for the rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens in routine clinical practice. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2001;20:724–31.

16. Noordhoek GT, van Embden JD, Kolk AH. Reliability of nucleic acid amplification for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: an international collaborative quality control study among 30 laboratories. *J Clin Microbiol*, 1996;34:2522-5.
17. Noordhoek GT, Mulder S, Wallace P, van Loon AM. Multicenter quality control study for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by nucleic amplification methods. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:295-301.
18. Mondragon-Barreto M, Vazquez-Chacon CA, Barron-Rivero C, Acosta-Blanco P, Jost KC Jr, Balandrano S, Olivera-Diaz H. Comparison among three methods for mycobacteria identification. *Salud Publica Mex* 2000;42:484-9.
19. Wu X, Zhang J, Liang J, Lu Y, Li H, Li C, Yue J, Zhang L, Liu Z. Comparison of three methods for rapid identification of mycobacterial clinical isolates to the species level. *J Clin Microbiol* 2007;1898-903.